

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-131141

(43)Date of publication of application : 08.05.2003

(51)Int.Cl. G02B 21/08
G01N 21/64
G02B 21/00
G02B 26/08

(21)Application number : 2001-325773

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP

(22)Date of filing : 24.10.2001

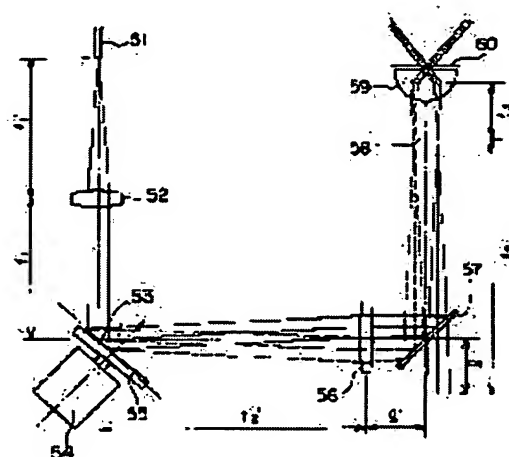
(72)Inventor : KINOSHITA KAZUHIKO
SHIO HAGUMU

(54) ROTATIONAL ZONE TOTAL REFLECTION ILLUMINATION MECHANISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a rotational zone total reflection illumination mechanism in which an illumination without polarization even at the periphery of a visual field is given and a fluorescence information of all directions is available.

SOLUTION: In a Koehler type illumination system in which an object is illuminated by introducing laser light to the peripheral part of an objective lens of a microscope, the rotational zone total reflection illumination mechanism is characterized in that the direction of illumination with the laser light is rotatable around the axis of the objective lens 56 of the microscope.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-131141

(P2003-131141A)

(43) 公開日 平成15年5月8日 (2003.5.8)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト ⁷ (参考)
G 0 2 B 21/08		G 0 2 B 21/08	2 G 0 4 3
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	Z 2 H 0 4 1
G 0 2 B 21/00		G 0 2 B 21/00	2 H 0 5 2
28/08		28/08	C
			E
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-325773(P2001-325773)

(22) 出願日 平成13年10月24日 (2001. 10. 24)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 木下 一彦

神奈川県横浜市都築区茅ヶ崎南4-12-12
-503

(72) 発明者 堀 育

神奈川県鎌倉市津1147-41

(74) 代理人 100099265

弁理士 長瀬 成城

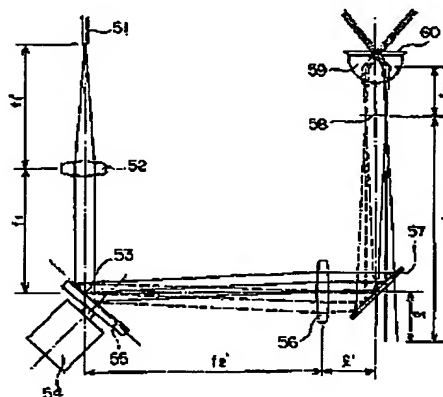
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 回転式輪帯全反射照明機構

(57) 【要約】

【課題】 視野周辺に至るまで偏光のない照明が可能であり、あらゆる方向の蛍光情報が得られる回転式輪帯全反射照明機構を提供する。

【解決手段】 顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザ光を導入し物体を照明するケーラー式照明系において、前記レーザ光による照明方向を顕微鏡対物レンズ56の軸心を中心に回転可能としたことを特徴とする回転式輪帯全反射照明機構。



(2)

特開2003-131141

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザービームを導入し物体を照明するケーラー式照明系において、前記レーザービームによる照明方向を顕微鏡対物レンズの軸心を中心に傾斜したまま回転可能としたことを特徴とする回転式輪帯全反射照明機構。

【請求項2】前記照明系は顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザービームを導入し全反射させ蛍光を発生させる照明系であることを特徴とする請求項1に記載の回転式輪帯全反射照明機構。

【請求項3】前記レーザービームによる照明方向を回転させるとともに使用する対物レンズに最適全反射角を与えるために、反射鏡の傾きを微調整できる機構を備えた反射鏡と、その反射鏡を回転させるための回転手段を備えていることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の回転式輪帯全反射照明装置

【請求項4】前記回転手段の回転中心は、反射鏡の回転中心軸から僅かに離れた位置に配置されていることを特徴とする請求項3に記載の回転式輪帯全反射照明装置

【請求項5】前記反射鏡の回転による振動が顕微鏡に悪影響を及ぼさぬ様、反射鏡を囲む回転手段は回転中心軸に形状直交ともに対象な構造を形成していることを特徴とする請求項請求項3または請求項4に記載の回転式輪帯全反射照明装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、顕微鏡対物レンズ周辺部にレーザービームを入射させる照明系において、このレーザービームの照明方向を回転可能にした回転式輪帯全反射照明機構に関するものであり、さらに具体的には全反射光を用いて蛍光を発生させる照明系に好適な回転式輪帯全反射照明機構に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来のエバネッセント照明を利用した全反射の原理を簡単に説明しておく。図5は顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザービームを入射させ全反射光を用いて蛍光を発生させる全反射照明（エバネッセント照明：通常内角 61° 、外角 68° ）の原理図である。

【0003】図において11は対物レンズ、12は油浸オイル、13はガラス、14は溶液であり、対物レンズ11の辺縁部にレーザービームを入射するとガラス・水溶液部で全反射し、表面近傍150nmの深さに光がしみ出す（この光の場をエバネッセント場という）。このエバネッセント場を蛍光照明に使うと背景光を著しく減少させコントラストの高い蛍光分子像が得られる。しかしながら、エバネッセント場を利用した1方向から照明する全反射照明では偏った蛍光情報しか得られないという問題がある。

【0004】また、図6は従来技術の他の一例で、中央を透光した輪帯全反射照明を行った照明光学系である。

図6において20は試料面、21は対物レンズ、22は対物レンズ端面、23は反射鏡、24は凸レンズ、25は視野絞り面（物体面と共役面）、26は中央透光絞り（対物レンズ端面22と共役）であり、この照明方式は試料面20にレーザービームを集光させる方式（クリチカル照明）を採用しており、試料面20を平行ビームで照明する図1とは異なる。本照明系では輪帯全反射照明を行うため、対物レンズ端面22と共役面に中央透光絞り26が設置されており、従来技術はこの照明方式を用いている。

【0005】しかしながら、この照明方式は試料面20にレーザービームを集光させるため視野の中央と周辺では明るさが異なり、均一な蛍光情報が得られないばかりか、視野の拡大が困難であった。また視野拡大のため拡散板を挿入すると明るさが大幅に低下する欠点があった。

【0006】ところで、一般の顕微鏡照明は明るく照明ムラがないケーラー照明が理想の照明となっている。図7にケーラー照明を用いた物体面の光状況を示す。図において、レーザービームは対物レンズ焦点位置（前側焦点面）Fに図示のごとく集光させなければ、物体面においては平行な光束で照明されない。平行性の優れたレーザービームを使用した場合、物体面中央光軸上は10、20、30、40の4方向からの光線が集光し明るくなる。しかしながら、視野周辺最上端部S点は1bと3bの光線しか集光せず周辺は暗くなるだけでなく偏光をもっているため、偏光方向を含めた均質照明をすることが難しく、正しい蛍光情報が得られないという問題がある。

【0007】近年、微小なプローブ（蛍光色素一分子）を用いてタンパク質の特定向きを知ることはダイナミックな動きをこごとらえることができ、今後ますます重要な課題となっている。しかし、この課題を解決するには前述した1方向から照明する全反射照明（エバネッセント照明）では偏った蛍光情報しか得られず、また、ケーラー照明方式の輪帯全反射照明が理想の照明といえるが、前記した問題があるため、採用例はみられない。

【0008】さらに、全反射照明の照明角度は試料を囲む媒質の屈折率変化（異なる媒質への対応、試料の温度変化）によって異なり厳密に対応しないと不要な背景光を招き、一分子蛍光色素の観察は困難となる。また使用する対物レンズの倍率（焦点距離）が替わるとこれに対応するには照明系レンズや輪帯絞りの大きさの異なるものにその都度交換する厄介な問題があった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明では、レーザービームを対物レンズの辺縁部に沿って移動（回転）させることにより、視野周辺に至るまで偏光のない照明が可能であり、あらゆる方向の蛍光情報が得られる回転式輪帯全反射照明機構を提供し、上記問題点を解決

(3)

特開2003-131141

3

することを目的とする。本発明に係る回転可能な全反射照明機構によれば、蛍光輝度の最大方向の情報から試料や蛍光色素の励起効率の高い方向を知ることができる。また、アナライザー（検光子）等の偏光素子と組み合わせれば蛍光色素一分子を用いたタンパク質の特定向きを知ることができダイナミックな動きを瞬時にとらえることができる。さらに、反射鏡の傾き微調整機構により、使用する対物レンズの焦点距離に厳密に対応することができるだけでなく、試料を囲む媒質の屈折率変化（異なる媒質への対応、試料の温度変化）に密に対応可能である。

【0010】

【課題を解決するための手段】このため本発明が採用した解決手段は、顕微鏡対物レンズの近縁部にレーザビームを導入し物体を照明するケーラー式照明系において、前記レーザビームによる照明方向を顕微鏡対物レンズの軸心を中心に傾斜したまま回転可能としたことを特徴とする回転式輪帯全反射照明機構である。また、前記照明系は顕微鏡対物レンズの近縁部にレーザビームを導入し全反射させ蛍光を発生させる照明系であることを特徴とする回転式輪帯全反射照明機構である。また、前記レーザビームによる照明方向を回転させるとともに使用する対物レンズに最適全反射角を与えるために、反射鏡の傾きを微調整できる機構を備えた反射鏡と、その反射鏡を回転させるための回転手段を備えていることを特徴とする回転式輪帯全反射照明装置である。また、前記回転手段の回転中心は、反射鏡の回転中心軸から僅かに離れた位置に配置されていることを特徴とする回転式輪帯全反射照明装置である。また、前記反射鏡の回転による振動が顕微鏡に悪影響を及ぼさぬ様、反射鏡を含む回転手段は回転中心軸に形状重畳ともに対象な構造を形成していることを特徴とする回転式輪帯全反射照明装置である。

【0011】

【実施形態】以下、本発明に係る実施形態としての光学系について説明すると、図1は本光学系全体の図、図2は反射鏡の一部断面図、図3は図2中A-A矢視断面図、図4（イ）（ロ）は反射鏡の傾きを変えた状態の光学系図である。図1において、51はレーザファイバー光源、52はコレクターレンズ、53は凸レンズ56の前側焦点面（コレクターレンズ52の後側焦点面とも一致）、54はモータ、55は反射鏡、56は凸レンズ、57はダイクロックミラー、58は対物レンズ前側焦点面、59は対物レンズ、60は物体面（試料面）である。

【0012】ここで、前記反射鏡55の構成を図2、図3を参照して詳細に説明すると、図2、図3において、61は反射鏡体、62は反射鏡体保持金物、63は本体金物であり、これらはいずれも円形形状をしている。反射鏡体61は反射鏡保持金物62に接合などにより固定されている。反射鏡体保持金物62の外周の対称位置

4

2カ所（回転軸となる直線上）には図3に示すようにビレット62aが設けてあり、本体金物63の外周2カ所に形成したねじ穴63aに取り付けたビレットねじ66、ロックナット67によってビレットねじ66軸上において回転可能状態で本体金物63に取り付けられている。

【0013】本体金物63には、反射鏡体61の傾き微調整を行うために微調整ねじ64が前記ビレットねじ軸を挟む対称位置2カ所に設けられており、微調整ねじ64の押し戻しによってビレットねじ66を軸にして反射鏡体の傾き微調整を行い、最後は微調整ねじ64をロックナット65により締め付けて固定できる構造となっている。

【0014】また本体金物は、その中心から僅かに離れた位置で回転手段としてのモータ54の回転軸4aに固定されている。これは、光学系において反射鏡55は物体面60（試料面）と共役な関係にあり、反射鏡表面のわずかなゴミなどが物体面60（試料面）に結像しないようモータ54の回転中心軸はわずかにシフトさせて設置されている。さらに反射鏡の回転による振動が顕微鏡に悪影響を及ぼさぬ様に図2、図3に示す如く、前記反射鏡を含む回転体が回転中心軸に形状重畳ともに対象な構造となるように形成されている。

【0015】上記構成からなる光学系において、レーザファイバー光源51はコレクターレンズ52により平行な光束となるが、反射鏡55が傾いたまま回転する機構となっているため輪光束となり、凸レンズ56周辺部に入射した光は凸レンズ56の後側焦点面58（対物レンズ59の前側焦点面）に集光する。

【0016】ここで、反射鏡55が $+\alpha$ の傾いていると図4（イ）に示すように、光軸に平行なレーザビームは2倍の α 傾きをもって凸レンズ56の後縁部に入射し光軸に平行な光となり対物レンズ59の対物レンズ前側焦点面を輪帯状に照明する。反射鏡55が $-\alpha$ の傾いていると図4（ロ）に示すように光軸に平行なレーザビームは（イ）とは反対に凸レンズ56の反対側縁部に入射し光軸に平行な光となり対物レンズ59の対物レンズ前側焦点面を輪帯状に照明する。

【0017】こうして集光した光は対物レンズ59（コンデンサーの役割）によって再び平行な光束となり物体面60（試料面）を照明する。上記のように反射鏡の傾き微調整機構と反射鏡の回転機構により、使用する対物レンズの焦点距離に厳密に対応することができるだけでなく、試料を囲む媒質の屈折率変化（異なる媒質への対応、試料の温度変化）に密に対応可能となる。また、反射鏡をモータによって360°回転させることで、試料面を周囲360°方向から照射することができ、1方向から照明する従来のエパネッセント照明の全反射照明の問題点、さらには従来のケーラー顕微鏡の持つ問題点を確実に解決することができる。また、レーザビームは

(4)

特開2003-131141

5

干渉性が非常に優れているため、照明光学系の干渉縞が発生する。蛍光観察の場合は励起光（照明光）がダイクロックミラーやフィルターで除かれる筈であるが、優れた可干渉性が励起光（照明光）源となり均質な蛍光像を得ることができないという問題がある。しかし、上記の構成からなる本光学系では、回転する反射鏡が試料面と光学的共役面に配置されており、この干渉縞が発生しても光軸に傾斜した反射鏡の回転により干渉縞は回転移動し平均化され、結果的には除去されたと同じ効果が得られるようになっている。

【0018】なお、全反射照明を行うため物体面（試料面）は 61° から 68° 以内の光が送られるよう反射鏡55の傾き角 α を調整すればよい。また、レーザファイバー光源51となるファイバーはコア径の小さいものが望ましい。

【0019】以上本発明の実施形態について説明してきたが、反射鏡の回転機構、あるいは反射鏡の傾きの微調整機構等は前述したものに限定することなく、同様の機能を達成できるものであれば他の機構を採用することができる。また本発明はその縮小または主要な特徴から逸脱することなく、他のいかなる形でも実施できる。そのため、前述の実施形態はあらゆる点で単なる例示にすぎず限定的に解釈してはならない。

【0020】

【発明の効果】本発明に係る回転可能な全反射照明機構によれば、視野周辺部まで均一な照明が可能となり、あらゆる方向の均一な蛍光情報が得られる。また、蛍光強度の最大方向の情報から試料や蛍光色素の励起効率の高い方向を知ることができる。また、アナライザー（検光子）等の偏光素子と組み合わせれば蛍光色素一分子を用いたタンパク質の特定向きを知ることができダイナミックな動きを個々にとらえることができる。さらに、反射鏡の傾き微調整機構により、使用する対物レンズの焦点距離に厳密に対応することができるだけでなく、試料を囲む媒質の屈折率変化（異なる媒質への対応、試料の温*

*度変化）に厳密に対応可能である。レーザビーム特有の可干渉によって生じた照明系の干渉縞は回転する反射鏡により短時間内に平均化され、結果的に除去されたと同じ効果が得られる。等々の優れた効果を奏することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明形態に係る回転式輪帯全反射照明機構を備えた光学系の構成図である。

【図2】反射鏡傾き微調整機構の断面図である。

19 【図3】図2中A-A矢視破断面図である。

【図4】反射鏡傾き微調整機構において反射鏡の傾きを変えた状態の光学系の説明図である。

【図5】エバネッセント場を利用した全反射照明の原理図である。

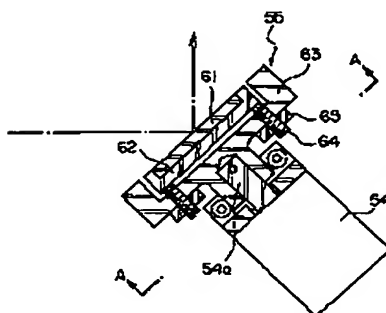
【図6】従来の中央遮光輪帯全反射照明の光学系図である。

【図7】ケーラー照明を用いた物体面の焦光状態を示す図である。

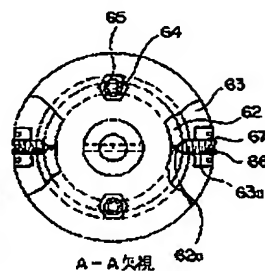
【符号の説明】

20	51	レーザファイバー光源
	52	コレクターレンズ
	53	凸レンズ56の前側焦点面
	54	モータ
	55	反射鏡
	56	凸レンズ
	57	ダイクロックミラー
	58	対物レンズ前側焦点面
	59	対物レンズ
	60	物体面
30	61	反射鏡体
	62	鏡体保持金物
	63	本体金物
	64	微調整ねじ
	65	ロックナット
	66	ピボットねじ

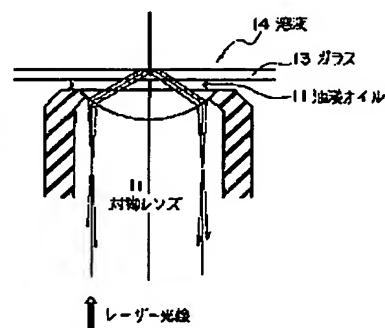
【図2】



【図3】



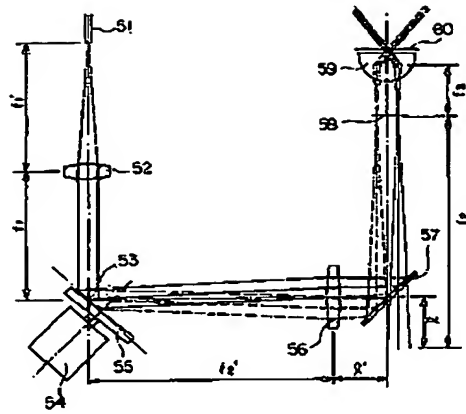
【図5】



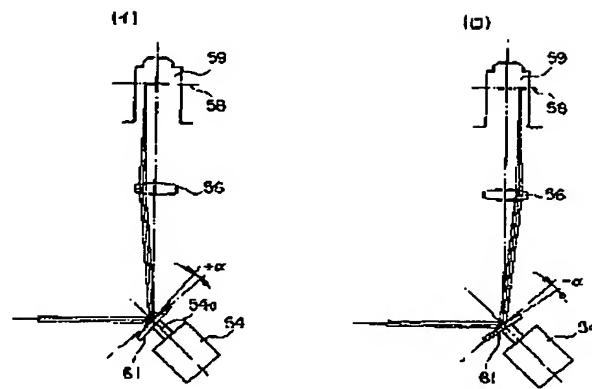
(5)

特開2003-131141

【図1】



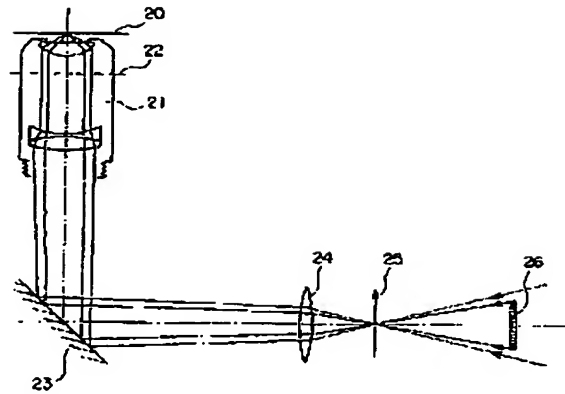
【図4】



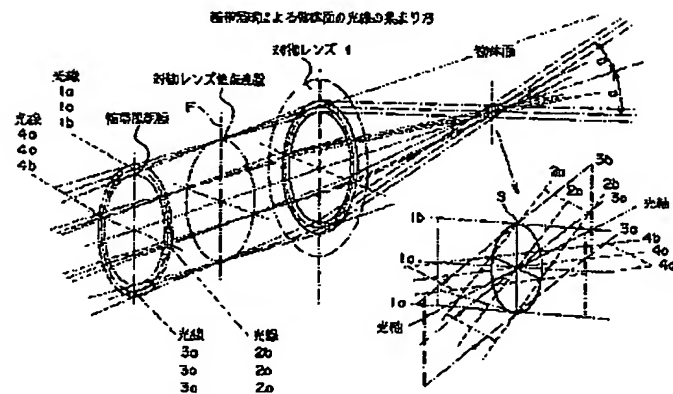
(6)

特開2003-131141

【図6】



【図7】



フロントページの続き

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 FA01 FA02
 GA02 GA06 GB03 GB19 HA01
 HA02 HA05 HA07 HA08 HA15
 JA02 KA02 KA09 MA11
 2H041 AA12 AB14 AC01 AZ02 AZ03
 2H052 AA09 AB03 AC02 AC15 AC17
 AC26 AC34 AD31